

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 51 345.7

Anmeldetag: 05. November 2002

Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim/DE

Bezeichnung: Verfahren und Vorrichtung zur Untersuchung von Schichten von Geweben in lebenden Tieren mit einem Mikroskop

IPC: A 61 B 5/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Klostermeyer".

**Verfahren und Vorrichtung zur Untersuchung von Schichten von
Geweben in lebenden Tieren mit einem Mikroskop**

Der Erfindung liegt ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Untersuchung von
5 Schichten von Geweben in lebenden Tieren mit einem Mikroskop zugrunde,
wobei das Mikroskop auf eine zu untersuchende Schicht eingestellt wird.

Mikroskopische Untersuchungen an lebenden Tieren werden an
verschiedenen Stellen des Tieres zum Zweck der Grundlagenforschung
10 vorgenommen. Insbesondere wird in verschiedenen Gewebebeschichten in
Gehirnen von Labortieren, z.B. Mäusen, die Interaktion der Neuronen nach
einem angelegten äußeren Reiz untersucht. Die Geschwindigkeit der
Reizübertragung und die Verschaltungen der Neuronen untereinander können
wertvolle Informationen liefern, die zu einem besseren Verständnis der
15 unterschiedlichen Gehirnkrankheiten (Parkinson, Alzheimer, Multiple
Sklerose) führen können. Es ist auch üblich, Operationen durchzuführen, bei
denen Gewebe freigelegt und laufend mikroskopisch kontrolliert wird, damit
zum Beispiel eine Veränderung des Blutflusses (durch Messen der Flussrate)
in peripheren Geweben nach Applikation von unterschiedlichen
20 Medikamenten beobachtet werden kann.

Bei diesen Untersuchungen wird das Tier ruhig gestellt und der Körperteil, an dem die Gewebeuntersuchung stattfindet, in einer für das Mikroskopieren geeigneten Position fixiert. Bei Untersuchungen am Gehirn wird der Kopf des

- 5 Tieres unter dem Mikroskop entsprechend fixiert. Trotz dieser Fixierung können Lageveränderungen des Gewebes bezüglich des Mikroskops hervorgerufen werden. Die Lageveränderungen können einerseits aufgrund einer durch das Tier oder am Tier verursachten Bewegung hervorgerufen werden. Andererseits entstehen Lageveränderungen des zu untersuchenden
- 10 Gewebes auch aufgrund von Organbewegungen des Tieres, besonders durch die Atmung und durch den Herz- und Pulsschlag des Tieres. Die dadurch hervorgerufenen Lageveränderungen des Gewebes stellen im Allgemeinen keine gleichmäßige Bewegung dar. Sie können allerdings in Richtung der optischen Achse des Mikroskops größer sein als die Schärfentiefe des
- 15 Mikroskops, was bei größeren Mikroskopvergrößerungen oder bei einem konfokalen Mikroskop häufig der Fall ist. Dadurch wird bei einer Serie von einzelnen Bildaufnahmen einer Gewebebeschicht mittels einer Kamera am Mikroskop ein Teil der Bilder unscharf aufgenommen. Dieser Teil der Bilder entsteht also während eines Zeitraumes, in dem sich das Gewebe aufgrund
- 20 seiner Bewegung nicht im Fokus des Mikroskops befindet. Anschließend müssen diese unscharfen Bilder durch Sichtkontrolle eines professionellen Benutzers aus dem gesamten Bilder-Datensatz herausgefunden und aussortiert oder gelöscht werden. Dieses Verfahren ist umständlich und zeitaufwendig. Wird eine nicht-elektronische Kameras verwendet, wird zudem
- 25 eine große Menge an unbrauchbarem Film-Material erzeugt, was für die Kosten ungünstig ist.

Die im Takt der Bewegungen des Tieres hervorgerufenen scharfen und unscharfen Mikroskopabbildungen sind natürlich auch bei der laufenden

- 30 Betrachtung der Gewebebeschicht durch das Mikroskop störend. Dasselbe gilt auch für Bildaufnahmen mit einer elektronischen Kamera und gleichzeitiger Darstellung der Bilder an einem Monitor oder Display. Die abwechselnd scharf

und unscharf gestellten Bilder führen bei laufender Beobachtung zu einer raschen Augenermüdung des Betrachters.

- Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren und eine Vorrichtung
- 5 anzugeben, mit denen Gewebe an lebenden Tieren unabhängig von Bewegungen des Tieres oder seiner Organe mikroskopisch untersucht werden kann.

- Die Aufgabe wird durch ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art durch
- 10 die folgenden Schritte gelöst:

- Erzeugen von Signalen, die den durch Bewegungen des Tieres oder durch Bewegungen von Organen des Tieres hervorgerufenen Lageveränderungen der Schicht entsprechen oder die zumindest den Beginn einer Lageveränderung anzeigen,

15 - Aufnehmen von Bildern oder / und Durchführen von optischen Messungen auch während der Lageveränderungen und

 - -- Speichern der Signale zusammen mit den entsprechenden Bildern oder / und den Ergebnissen der Messungen zur späteren Auswertung, bei der an Hand der Signale die Bilder oder Messungen bei scharf eingestellter zu

20 untersuchender Schicht herausgefunden werden oder

 - -- Verarbeiten der Signale derart, dass die Lageveränderungen in Echtzeit ausgeglichen werden und dadurch die zu untersuchende Schicht stets scharf gestellt ist.

- 25 Als Alternative wird die Aufgabe durch ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art durch die folgenden Schritte gelöst:

- Stimulieren des Tieres zum Bewirken von definierten Organbewegungen und somit von definierten Lageveränderungen der Schicht,
- Aufnehmen von Bildern oder / und Durchführen von optischen Messungen

30 auch während der Lageveränderungen, und

 - -- Speichern der während oder nach der Stimulation aufgenommenen Bilder

oder Ergebnisse der Messungen zur späteren Auswertung oder
- -- Ausgleichen der Lageveränderungen der Schicht in Abhängigkeit der
Stimulation.

- 5 Zudem wird die Aufgabe wird durch die Merkmale der Vorrichtungsansprüche
14 oder 16 gelöst.

Durch die erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen wird die mikroskopische Untersuchung von Gewebebeschichten am lebenden Tier wesentlich erleichtert, da sie unabhängig von den Bewegungen des Tieres oder seiner Organe erfolgen kann. Die Bewegung der zu untersuchenden Gewebebeschicht, die insbesondere durch den Herzschlag des Tieres verursacht wird, wird entweder kompensiert, so dass sich die Gewebebeschicht stets im Fokus des Mikroskops befindet und dadurch die Gewebebeschicht stets scharf abgebildet werden kann. Oder es wird eine Serienaufnahme von Bildern durchgeführt, wobei sowohl die Bilder des scharf als auch unscharf abgebildeten Gewebes zusammen mit den Signalen, die den Lageveränderungen der Schicht entsprechen, aufgezeichnet werden. Bei einer späteren Auswertung können die unscharfen Bilder, die in die Zeit des Herzschlages und somit der Bewegung der Gewebebeschicht fallen, automatisch herausgefunden und verworfen werden. Diese unbrauchbaren Bilder müssen also nicht mehr einzeln durch einen Betrachter selektiert werden. Dies erspart somit Zeit und Kosten.

25 Die Untersuchungen der Gewebebeschicht beziehen sich einerseits auf die bildhafte Darstellung des Gewebes oder auch einzelner Zellen oder Zellorganellen im Gewebe mit Hilfe des Mikroskops. Es werden Form, Struktur oder Färbungen des Gewebes oder der Zellen beobachtet und auf Veränderungen untersucht. Vor allem werden auch dynamische
30 Veränderungen untersucht.

Andererseits werden auch quantitative Messungen vorgenommen, z.B. um die Menge und Verteilung bestimmter Substanzen in den Zellen zu ermitteln.

Diese Substanzen können entweder von außen zugeführte chemische Stoffe oder auch im Organismus vorhandene Biomoleküle oder Ionen sein

- 5 (beispielsweise werden lokale Änderungen der Ca-Ionen-Konzentration untersucht). Durch bekannte Methoden der selektiven Anregung der Moleküle im infraroten, sichtbaren oder ultravioletten Wellenlängenbereich des Lichtes und durch die entsprechende Spektroskopie der Moleküle können ihre Menge und Verteilung quantitativ bestimmt werden. Eine spezielle Methode ist hierbei
- 10 die Fluoreszenzanalyse oder Fluoreszenzspektroskopie, bei der spezifisch ein Fluoreszenzfarbstoff, der vorher an ein Molekül gebunden wird und dieses dadurch markiert, mit Licht angeregt und das frequenzverschobene emittierte Fluoreszenzlicht gemessen wird. Dadurch wird die Verteilung der markierten Moleküle in der Gewebeschicht und damit auch ihrer spezifischen
- 15 Bindungsstellen im Gewebe quantitativ bestimmt. Diese Untersuchungen können mit Hilfe der Erfindung unabhängig von den Lageveränderungen der Gewebeschicht durchgeführt werden.

- 20 Die Untersuchungen können mit allen Mikroskoparten vorgenommen werden, sowohl mit einem herkömmlichen Lichtmikroskop, als auch mit einem Fluoreszenz- oder Polarisationsmikroskop oder einem konfokalen Mikroskop. Bei hohen Mikroskopvergrößerungen und insbesondere bei konfokalen Scanningmikroskopen, bei denen ein Objekt räumlich punktförmig gerastert wird, ergibt sich eine hohe axiale und laterale Auflösung. Die hohe axiale
- 25 Auflösung bedeutet eine sehr geringe Schärfentiefe, so dass nur eine sehr dünne Schicht innerhalb des Gewebes scharf abgebildet wird. Durch die Abbildung auch tieferliegender Gewebeschichten kann ein räumliches Bild der gesamten Gewebeschicht zusammengesetzt werden. Aufgrund der geringen Schärfentiefe führen bereits geringe Lageveränderungen der Gewebeschicht
- 30 dazu, dass die scharf gestellte Schicht den Fokusbereich des Mikroskops verlässt.

Erfindungsgemäß werden die Lageveränderungen der Gewebeschicht erfasst oder das Tier wird derart stimuliert, dass es zu definierten Lageveränderungen der Gewebeschicht kommt. Die Lageveränderungen der Schicht können dabei direkt oder indirekt erfasst werden, d.h. es werden entweder direkt die

5 Lageveränderungen der zu beobachtenden Schicht aufgenommen oder vermessen oder es werden die Bewegungen anderer Teile des Tieres außerhalb der zu beobachtenden Schicht aufgenommen oder vermessen, um daraus indirekt die Lageveränderungen der zu beobachtenden Schicht zu bestimmen. Hierzu gibt es verschiedene Ausführungsmöglichkeiten, die im

10 Folgenden beispielhaft erwähnt werden.

Die Lageveränderungen der Gewebeschicht können durch optische Abtastung entweder der Schicht selbst oder durch optische Abtastung anderer Teile des Tieres, die die Bewegung der Gewebeschicht auslösen, erfasst werden. Diese anderen Teile des Tieres sind beispielsweise der Brustkorb, der sich bei der Atmung oder beim Herzschlag des Tieres bewegt oder eine von außen sichtbare Schlagader des Tieres, die sich im Rhythmus des Herz- und Pulsschlages bewegt. Die optische Abtastung dieser sich bewegenden Stellen am Tier kann dadurch erfolgen, dass mit Hilfe eines Laserstrahls die Konturen dieser Stellen gescannt werden. Dadurch ergibt sich ein Profil, das sich im Rhythmus der Bewegungen ändert. Die daraus gewonnenen Signale können zusammen mit den zugeordneten Bildern der Gewebeschicht oder den Ergebnissen der optischen Untersuchungen an der Gewebeschicht für eine spätere Auswertung gespeichert werden, oder sie werden zum sofortigen

15 Ausgleich der Lageveränderungen der Gewebeschicht z.B. durch

20 Nachfokussieren mit dem Mikroskop verwendet.

In analoger Weise kann die optische Abtastung auch durch Bildaufnahmen der Gewebeschicht oder der sich bewegenden Stellen am Tier erfolgen. Durch

30 Bildverarbeitung, z.B. mit Kontrastfunktionen, können die Bewegungen erfasst und die daraus gewonnenen Signale wie bereits erwähnt gespeichert oder direkt

zum sofortigen Ausgleich der Lageveränderungen des Gewebes verwendet werden.

Eine andere Ausführungsmöglichkeit zum Erfassen der Lageveränderungen
5 des Gewebes besteht im Ermitteln des Herzschlages des Tieres durch Elektroden, die am Tier angebracht werden und die elektrische Signale liefern ähnlich wie bei einem EKG (Elektrokardiogramm) oder EEG (Elektroenzephalogramm). Diese elektrischen Signale sind ein Indikator für die Lageveränderungen des Gewebes und können entsprechend ausgewertet
10 werden.

Eine weitere Ausführungsmöglichkeit besteht im Messen des Pulses des Tieres in analoger Weise wie bei Pulsmessgeräten für den Menschen. Ein Drucksensor misst den Pulsschlag des Tieres und wandelt die
15 Druckänderungen des Pulses in entsprechende elektrische Signale um. Diese werden mit einem Analog-Digital-Wandler in digitale Signale konvertiert, die für die Lageveränderungen des Gewebes ausgewertet werden. Bei Untersuchungen von Gehirngewebe kann der Pulsschlag auch direkt im Gehirn selbst gemessen werden.

20 Weiterhin ist es möglich, die Lageveränderungen der Gewebeschicht vorab nach einer der oben genannten Methoden zu vermessen, um eine Kalibrierung zu erreichen. Die Lageveränderungen entsprechen zwar nicht einer regulären Bewegung der Schicht, sie sind aber in gewissen Grenzen
25 reproduzierbar. Der unterschiedliche Blutdruck bei den verschiedenen Phasen der Herzkontraktion verursacht eine Volumenänderung im Bereich der peripheren Blutgefäße. Diese Volumenänderung äußert sich in einer Art von Bewegung des umliegenden Gewebes. Da diese Bewegung sich zu einem hohen Grad wiederholt, kann die Optik gezielt nachgeführt werden. Durch eine
30 entsprechende Kalibrierung wird das Mikroskop bzw. seine Fokuseinrichtung entsprechend programmiert, so dass sich die Gewebeschicht stets im Fokus

des Mikroskops befindet. Die Bilddatenaufnahme erfolgt synchron mit der sowohl axialen wie lateralen Bewegung der Gewebeschicht.

- Im übrigen kann der Beginn der Lageveränderungen der Gewebeschicht auch
- 5 stimuliert werden. Eine Stimulation kann in vielfacher Weise erfolgen, beispielsweise durch einen elektrischen Impuls (über Elektroden oder durch einen Herzschrittmacher), einen mechanischen Reiz (z.B. durch Ziehen an den Tasthaaren des Tieres), einen Temperaturreiz oder einen Lichtreiz. Ein Lichtreiz kann insbesondere durch eine Multi-Photonenanregung z.B. mit
- 10 einem konfokalen Scanning-Mikroskop erfolgen und tief in das Gewebe eindringen ohne die Oberfläche des Gewebes zu schädigen. Durch derartige Reize kann von vornherein bestimmt werden, welche Zeitpunkte für Bildaufnahmen oder Messungen an der Gewebeschicht optimal sind.
- 15 Die Stimulierung des Tieres kann auch für sich allein erfolgen, ohne dass die Lageveränderungen der Gewebeschicht direkt oder indirekt erfasst werden müssen. Dies setzt natürlich voraus, dass die Lageveränderungen definiert und reproduzierbar sind. Durch geeignete Stimulierung des Tieres am Herzen oder an bestimmten Nervenpunkten können für die Untersuchung der
- 20 Gewebeschicht ausreichend gute reproduzierbare Bewegungen bewirkt werden. Hierzu kann ein Herzschrittmacher verwendet werden, wobei die Taktfrequenz und Amplitude seiner elektrischen Signale entsprechend eingestellt werden.
- 25 Gegebenenfalls können die Taktfrequenz und insbesondere die Amplitude der Signale des Herzschrittmachers derart eingestellt werden und dadurch das Herz des Tieres derart stimuliert wird, dass die durch die Herz- und Pulsbewegung hervorgerufenen Lageveränderungen der zu untersuchenden Schicht sogar innerhalb der Schärfentiefe des Mikroskops liegen. In diesem
- 30 Fall können sämtliche aufgenommenen Bilder der Gewebeschicht und

sämtliche Messungen genutzt werden. Eine Aussortierung unscharfer Bilder entfällt.

- Es ist bekannt, dass der Beginn des Herzschlages der Lageveränderung der Gewebeschicht vorausseilt. Dies entspricht einer Phasen- oder Zeitdifferenz zwischen dem Beginn des Herzschlages und seiner Auswirkung auf die Lage der Gewebeschicht und deren räumliche Veränderung. Die Zeitdifferenz kann mit einer elektronischen Schaltung (Zeit-Delay) oder per Software eingestellt werden. Für die erfindungsgemäßen Methoden und alle bisher genannten Beispiele kann eine solche Zeitverzögerung eingesetzt werden, so dass der Beginn für die Aufnahmen von Bildern, die Durchführung von Messungen oder das Ausgleichen der Lageveränderungen der Gewebeschicht erst nach der eingestellten Zeitverzögerung erfolgt. Dadurch sind Zeitfenster definiert, in denen sich die Gewebeschicht in vorteilhafter Weise in einem fokussierten Zustand befindet.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand des in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispiels näher erläutert. Die Zeichnung zeigt schematisch in:

- Fig. 1 eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung von Schichten von Geweben in lebenden Tieren.

Die Fig.1 zeigt in schematischer Weise eine Anordnung mit einem auf einem Mikroskopstisch 9 befindlichen lebenden Tier und mit einem Mikroskop 2, mit dem Untersuchungen von Schichten 1 von Geweben in dem Tier durchgeführt werden. Das Mikroskop 2 wird mit Hilfe einer Fokussiereinrichtung 7 auf eine Gewebeschicht 1 fokussiert, so dass diese beim Blick durch das Mikroskop 2 oder bei Aufnahmen mit einer Kamera 6 scharf erscheint bzw. abgebildet wird. Die Schicht 1 in Fig. 1 soll eine Gehirn-Gewebeschicht des Tieres darstellen. In diesem Fall wird der Kopf des Tieres in einer in Fig. 1 nicht dargestellten Klemmvorrichtung fixiert. Oftmals wird zudem das Tier medikamentös ruhig

gestellt. Trotz der Fixierung des Kopfes oder der medikamentösen Ruhigstellung bewegt sich die Schicht 1 insbesondere aufgrund des Herzschlags des Tieres. Durch diese Lageveränderung kann die Schicht 1 aus der Fokusebene des Mikroskops 2 gelangen. Die betrachteten oder 5 aufgenommenen Bilder der Schicht 1 sind im Rhythmus des Herzschlags scharf und unscharf. Dasselbe gilt auch, wenn zusätzlich oder anstelle der Bilder optische Messungen mit einer Messeinrichtung 8 durchgeführt werden, z.B. photometrische Messungen an der Schicht 1 mit einem Spektralphotometer. Natürlich kann die Messeinrichtung 8 auch ein 10 Polarimeter, eine Fluoreszenzeinrichtung oder eine sonstige am Mikroskop 2 ankoppelbare Messvorrichtung sein.

Erfindungsgemäß erfasst ein Bewegungs-Messmittel 3 die Lageveränderungen der Schicht 1 oder zumindest den Beginn ihrer 15 Lageveränderungen, wobei das Bewegungs-Messmittel 3 entsprechende Signale erzeugt. Das Bewegungs-Messmittel 3 besteht im Falle des Ausführungsbeispiels gemäß Fig. 1 aus einem am Tier befestigten Sensor, der die Herzschläge des Tieres registriert und der mit einer entsprechenden Elektronik zur Erzeugung von Signalen verbunden ist. Der Sensor kann eine 20 mechanische Messung durchführen, z.B. eine Druck- oder Bewegungsmessung. Ein Druck- oder Bewegungssensor wird vorzugsweise an oder in der Nähe einer Schlagader des Tieres angebracht. Dadurch kann er den Herz- oder Pulsschlag des Tieres aufgrund von Druck- oder Bewegungsänderungen erfassen. Andererseits kann der Sensor auch aus 25 zumindest einer Elektrode bestehen, die am Tier angebracht wird und die die elektrischen Signale des Tierherzens erfasst.

Die Signale des Bewegungs-Messmittels 3 gelangen entweder in einen Speicher 4 zusammen mit den zugehörigen Bildern der Kamera 6 oder / und 30 mit den Messergebnissen der Messeinrichtung 8. Sie werden zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet, wobei ein automatisches Aussortieren derjenigen Bilder oder Messergebnisse durchgeführt wird, die bei einer Lage

der Schicht 1 außerhalb des Fokus des Mikroskops 2 aufgenommen wurden. Dieses Verfahren erspart ein manuelles Auswerten der Serie von Bildern oder Messwerten.

- 5 Alternativ zu der Speicherung der Signale des Bewegungs-Messmittels 3 können die Signale auch direkt einer Steuereinheit 5 zugeführt werden. In der Steuereinheit 5 werden der Signale derart verarbeitet, dass die Lageveränderungen der Schicht 1 ausgeglichen sind und dadurch die Gewebeschicht 1 stets scharf gestellt ist. Die Steuereinheit 5 steuert entweder 10 die Fokussiereinrichtung 7 des Mikroskops 2 an, so dass durch Nachfokussieren die Schicht 1 in der Fokusebene des Mikroskops bleibt. Oder die Steuereinheit 5 steuert entsprechend der Signale des Bewegungs-Messmittels 3 direkt den z-Trieb des Mikroskopisches 9 an. Durch das 15 derartige Nachführen der Schicht 1 sind die durch die Herz- und Pulsbewegungen des Tieres ausgelösten Lageveränderungen der Gewebeschicht 1 on-line ausgeglichen. Anstelle des Mikroskopisches 9 kann selbstverständlich auch das Objektiv des Mikroskops entsprechend 20 nachgeführt werden. Aufgrund der laufenden Scharfstellung der Schicht 1 sind die aufgenommenen Bilder- oder Messserien vollständig verwendbar und bedürfen keiner nachträglichen Aussortierung.

- Die Steuereinheit 5 kann auch derart ausgeführt sein, dass dasjenige Signal des Bewegungs-Messmittels 3, das den Beginn eines Herzschlages anzeigt, zeitverzögert wird. Nach der Zeitverzögerung generiert die Steuereinheit 5 25 einen Triggerpuls, der die Bildaufnahmen oder die Messungen an der Gewebeschicht 1 auslöst. Somit kommt das Triggersignal zeitverzögert gegenüber den Beginn des Pulsschlags zur Wirkung und kompensiert bei entsprechender Einstellung der Verzögerungszeit das Vorauseilen des Herzschlags gegenüber dem Beginn der Lageveränderung der Schicht 1. 30 Durch diese Maßnahme werden bei konventionellen Mikroskopen unscharfe Bilder erst gar nicht aufgenommen.

Zudem kann das Triggersignal dazu benutzt werden, dass nur dann Licht für die Beleuchtung der Schicht 1 zur Verfügung steht, wenn tatsächlich Bildaufnahmen vorgenommen werden, um Zellschädigungen durch das Licht (Photoschädigung) zu minimieren. Der Bildaufnahmeprozess wird nur dann 5 getriggert, wenn die Daten an bestimmten Fokuspositionen benötigt werden.

Auch beim Einsatz eines konfokalen Mikroskops, bei dem aufgrund des konfokalen Prinzips keine unscharfen Bildaufnahmen entstehen, sollen in diesem Beispiel nur die Bilder der Gewebeschicht 1 für eine bestimmte 10 Fokuslage aufgenommen werden. Alle anderen Fokuslagen sind unerwünscht. Mit Hilfe des Triggersignals wird stets die bestimmte Fokuslage ausgewählt und es werden nur die Bilder der Schicht 1 in dieser Fokuslage aufgenommen. Dadurch können die zeitlichen Veränderungen der Schicht 1 in dieser Fokuslage unabhängig von der Lageveränderung der Schicht 1 15 beobachtet werden.

Im übrigen können alternative Bewegungs-Messmittel 3 auch die Kamera 6 oder eine separate, in Fig. 1 nicht dargestellte Kamera sein, mit denen durch entsprechende Bildverarbeitung von laufend aufgenommenen Bildern die 20 Fokuslage der Gewebeschicht 1 ermittelt und entsprechend korrigiert wird. Auch mit anderen optischen Vermessungsmethoden wie mit einem Laserscanner kann die Lage der Gewebeschicht 1 direkt oder indirekt durch Scannen einer Schlagader des Tieres ermittelt werden. Dadurch werden scharfe und unscharfe Bilder bei konventionellen Mikroskopen selektiert oder 25 es wird die Kamera 6 entsprechend getriggert (insbesondere bei konfokalen Mikroskopen).

Eine alternative Möglichkeit zum Erfassen der Lageveränderung der Gewebeschicht 1 besteht in der gezielten Stimulierung des Tieres, z.B. durch 30 einen Herzschrittmacher. Die elektrischen Ausgangssignale des Herzschrittmachers können in ihrer Taktfrequenz und Amplitude für eine

geeignete Stimulierung und somit Bewegung des Herzens eingestellt werden. Die Bewegung des Herzens und des Pulsschlages ist dadurch vorbekannt und somit auch die Übertragung der Bewegung auf die Lage der Gewebeschicht 1. Durch eine dermaßen definierte Lageveränderung der Schicht 1 kann eine 5 entsprechende Nachfokussierung oder eine entsprechende Triggerung für die Bildaufnahmen erfolgen.

Die Erfindung eignet sich besonders für den Einsatz in einem konfokalen Mikroskop, mit dem viele Gewebeschichten 1 insbesondere auch in tiefen 10 Lagen im Gewebe hochauflöst beobachtet und vermessen werden können. Hierbei werden vorteilhafterweise nicht-lineare Effekte ausgenutzt wie die Multi-Photonen-Anregung bei der Fluoreszenz. Auch die Infrarot-Mikroskopie mit infraroter Beleuchtung und Detektion ist für Aufnahmen und Messungen aus tieferen Gewebeschichten geeignet.

15 Eine piezoelektrische Fokussiereinrichtung kann besonders für den Zweck einer schnellen und präzisen Nachfokussierung eingesetzt werden. Dabei ist es zusätzlich von Vorteil, wenn die piezoelektrische Fokussiereinrichtung im Objektiv des Mikroskops 2 oder in den Optiken des Detektorsystems integriert 20 ist. Der Abstand zwischen dem Objektiv und dem Objekt bleibt dabei konstant. Dies verhindert ein versehentliches Berühren von Objektiv und Objekt, was bei einer Fokussierung durch eine z-Verstellung des Mikroskopisches (in Richtung zum Objektiv) sonst möglich wäre. Zudem ist im Vergleich zur Fokussierung mit dem Mikroskopisch die Massenträgheit beim Verfahren der 25 mechanischen Bauteile für die Fokussierung deutlich geringer und es werden zusätzliche Bewegungen des Objektes (Schicht 1) aufgrund des Fokussierens vermieden.

30 Alternativ kann auch ein sogenanntes Focussing-Nose-Piece zum schnellen und präzisen Nachfokussieren verwendet werden, das aus einem Objektivrevolver besteht, der teilweise mit Objektiven bestückt ist, damit über

der Probe ausreichend Arbeitsplatz, z.B. zum Anbringen von Elektroden usw., vorhanden ist.

- Zur Kompensation von lateralen Bewegungen der Gewebeschicht 1 können
- 5 optische oder mechanische Stellelemente im Detektorsystem verwendet werden. Beim Scanning-Mikroskop kann dabei der vorhandene Scanner selbst verwendet werden (Offset) oder es werden zusätzliche optische Stellelemente zum Verkippen des Scannstrahles eingeführt und vorzugsweise in konjugierten Ebenen der Eintrittspupille des Scanning-Mikroskops
- 10 angeordnet.

Bezugszeichenliste

- 1 Gewebeschicht eines lebenden Tieres
- 2 Mikroskop
- 3 Bewegungs-Messmittel
- 5 4 Speicher
- 5 Steuereinheit
- 6 Kamera
- 7 Fokussiereinrichtung
- 8 Messeinrichtung
- 10 9 Mikroskoptisch

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung von Schichten (1) von Geweben in lebenden Tieren mit einem Mikroskop (2), wobei das Mikroskop (2) auf eine zu untersuchende Schicht (1) eingestellt wird, **gekennzeichnet durch**
 5 **folgende Schritte:**
 - Erzeugen von Signalen, die den durch Bewegungen des Tieres oder durch Bewegungen von Organen des Tieres hervorgerufenen Lageveränderungen der Schicht (1) entsprechen oder die zumindest den Beginn einer Lageveränderung anzeigen,
 - Aufnehmen von Bildern oder / und Durchführen von optischen Messungen auch während der Lageveränderungen und
 - -- Speichern der Signale zusammen mit den entsprechenden Bildern oder / und den Ergebnissen der Messungen zur späteren Auswertung, bei der an Hand der Signale die Bilder oder Messungen bei scharf eingestellter zu untersuchender Schicht (1) herausgefunden werden oder
 - -- Verarbeiten der Signale derart, dass die Lageveränderungen in Echtzeit ausgeglichen werden und dadurch die zu untersuchende Schicht (1) stets scharf gestellt ist.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die den Lageveränderungen der Schicht (1) entsprechenden Signale durch optische Abtastung der Schicht (1) oder anderer, die Bewegung der Schicht (1) auslösender Teile des Tieres, erzeugt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die optische Abtastung durch Scannen mit einem Laser oder durch Bildaufnahmen und entsprechender Bildverarbeitung erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die den Lageveränderungen der Schicht (1) entsprechenden Signale durch den Herzschlag des Tieres erzeugt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Herzschlag mittels Elektroden oder durch den Puls des Tieres gemessen wird.
- 10 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Lageveränderungen der Schicht (1) für eine Kalibrierung vorab vermessen werden.
- 15 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Ausgleich der Lageveränderungen in Echtzeit durch eine Fokussiereinrichtung (7) erfolgt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Beginn der Lageveränderungen elektrisch, insbesondere durch einen Herzschrittmacher stimuliert wird.
9. Verfahren zur Untersuchung von Schichten (1) von Geweben in lebenden Tieren mit einem Mikroskop (2), wobei das Mikroskop (2) auf eine zu untersuchende Schicht (1) eingestellt wird, **gekennzeichnet durch folgende Schritte:**
 - Stimulieren des Tieres zum Bewirken von definierten Organbewegungen und somit von definierten Lageveränderungen der Schicht (1),
 - Aufnehmen von Bildern oder / und Durchführen von optischen Messungen auch während der Lageveränderungen, und
- 20
- 25

- -- Speichern der während oder nach der Stimulation aufgenommenen Bilder oder Ergebnisse der Messungen zur späteren Auswertung oder
 - -- Ausgleichen der Lageveränderungen der Schicht (1) in Abhängigkeit der Stimulation.
- 5 10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Stimulierung des Tieres am Herzen oder an geeigneten Nervenpunkten erfolgt.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Stimulierung durch einen Herzschrittmacher erfolgt, wobei dessen Taktfrequenz und Amplitude wählbar eingestellt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Amplitude des Herzschrittmachers und das Mikroskops derart eingestellt werden, dass die Lageveränderungen der Schicht (1) im wesentlichen innerhalb der Schärfentiefe des Mikroskops liegen.
- 15 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Aufnahme der Bilder oder die Durchführung der Messung oder das Ausgleichen der Lageveränderungen der Schicht (1) nach einer einstellbaren Zeitverzögerung ab Beginn der Lageveränderung erfolgt.
- 20 14. Vorrichtung zur Untersuchung von Schichten (1) von Geweben in lebenden Tieren mit einem Mikroskop (2), **gekennzeichnet durch**
 - eine Fokussiereinrichtung (7) zur Einstellung des Mikroskops (2) auf eine Schicht (1),
 - ein Bewegungs-Messmittel (3) zur direkten oder indirekten Erfassung von Lageveränderungen oder zumindest des Beginns von Lageveränderungen der Schicht (1), die durch Bewegungen des Tieres oder von Organen des Tieres hervorgerufen sind, wobei das Bewegungs-
- 25

- Messmittel (3) entsprechende Signale erzeugt,
- eine Kamera (6) zur Aufnahme von Bildern oder / und eine Messeinrichtung (8) zur Durchführung von optischen Messungen auch während der Lageveränderungen, und
- 5 - -- einen Speicher (4) zur Speicherung der Signale zusammen mit den zugehörigen Bildern der Kamera (6) oder / und mit den Messergebnissen der Messeinrichtung zur späteren Auswertung oder
- -- eine Steuereinheit (5) zur Verarbeitung der Signale derart, dass die Lageveränderungen der Schicht (1) in Echtzeit ausgleichbar sind.
- 10 15. Vorrichtung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Bewegungs-Messmittel (3) die Lageveränderungen durch optische Vermessung, Bildaufnahmen, mechanische Messung oder durch elektrische Messung an Elektroden am Tier erfassen.
16. Vorrichtung zur Untersuchung von Schichten (1) von Geweben in lebenden Tieren mit einem Mikroskop (2), **gekennzeichnet durch**
- 15
 - eine Fokussiereinrichtung (7) zur Einstellung des Mikroskops (2) auf eine Schicht (1),
 - ein Stimulationsmittel zum Bewirken von definierten Organbewegungen und somit definierten Lageveränderungen der Schicht (1),
 - eine Kamera (6) zur Aufnahme von Bildern oder / und eine Messeinrichtung (8) zur Durchführung von optischen Messungen auch während der Lageveränderungen, und
 - -- einen Speicher (4) zum Speichern der während oder nach der Stimulation aufgenommenen Bilder oder Messergebnisse der Messeinrichtung zur späteren Auswertung oder
 - -- eine Steuereinheit (5) zum Ausgleichen der Lageveränderungen der Schicht (1) in Abhängigkeit der Stimulation.
- 20 25. Vorrichtung nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Stimulationsmittel ein Herzschrittmacher ist.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Mittel zur Zeitverzögerung vorgesehen ist, mit dem der Beginn der Bildaufnahmen oder Messungen an der Schicht (1) gegenüber dem Beginn der Lageveränderungen der Schicht (1) oder gegenüber dem Beginn der Stimulierung zeitlich verschiebbar ist.
- 5
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 18, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Mikroskop (2) ein Laser-Scanning-Mikroskop ist.
- 10
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Messeinrichtung (8) ein Photometer, Polarimeter oder eine Fluoreszenzeinrichtung ist.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 20, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Fokussiereinrichtung (7) eine piezoelektrische Fokussiereinrichtung oder ein Focussing-Nose-Piece ist.
- 15
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 21, **dadurch gekennzeichnet, dass** optische oder mechanische Stellelemente im Detektorsystem zur Kompensation von lateralen Bewegungen der Schicht (1) vorgesehen sind.
- 20
23. Vorrichtung nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Stellelemente die in einem Scanner eines Scanning-Mikroskops vorhandenen Stellelemente sind oder zusätzliche optische Stellelemente zum Verkippen eines Scannstrahles eines Scanning-Mikroskops vorgesehen sind, die vorzugsweise in konjugierten Ebenen der Eintrittspupille des Scanning-Mikroskops angeordnet sind.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Untersuchung von Schichten (1) von Geweben in lebenden Tieren mit einem Mikroskop (2).

Das Mikroskop (2) wird auf eine Schicht (1) eingestellt und von der Schicht (1)

- 5 Bilder aufgenommen oder an ihr optische Messungen durchgeführt. Durch Bewegungen des Tieres oder dessen Organe werden Lageveränderungen der Schicht (1) hervorgerufen. Die Lageveränderungen werden erfasst, wobei entsprechende Signale erzeugt werden. Die Signale werden zusammen mit den entsprechenden Bildern oder Ergebnissen der Messungen zur späteren
- 10 Auswertung gespeichert oder sie werden derart verarbeitet, dass die Lageveränderungen zur Untersuchung der Schicht (1) ausgeglichen werden. Dadurch kann die Schicht (1) unabhängig von der Bewegung des Tieres oder seiner Organe mikroskopisch in qualitativer oder quantitativer Art untersucht werden.

15

(Fig.1)

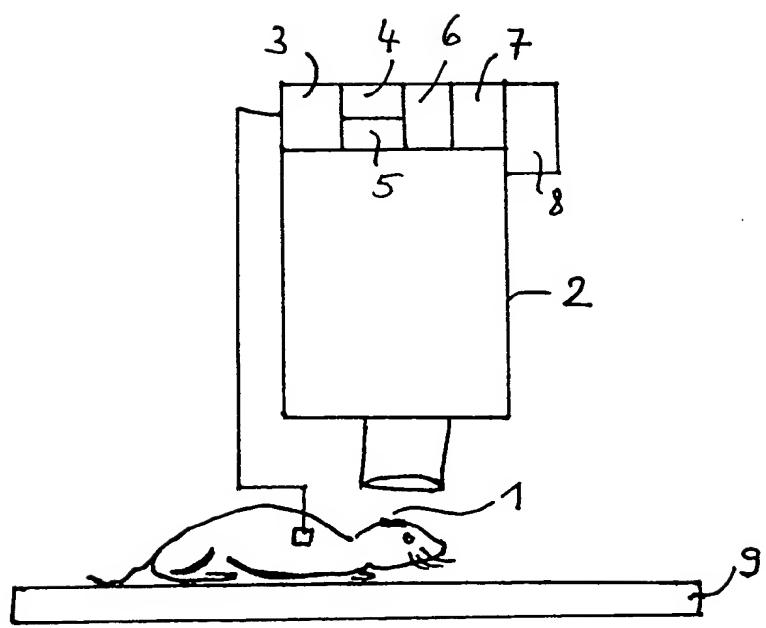


Fig. 1